

し、ドライヤー(冷風)で乾燥させて細菌を皮膚につけた。塗布菌数は塗布前後の綿棒の重量を測定し、その差を塗布面積で除して求めた。

頸静脈を17G採血針で穿刺し、初流血除去回路(Fig. 1)を使用して採血した。採血開始後の血液を初流血除去側の回路に通し、約4.5mLずつ5本の無菌試験管に採取した後、本採血側の回路に切り替え、さらに同量ずつ5本、計10本を採集した。試験管には抗凝固剤としてACD液0.5mLをあらかじめ加えておいた。各菌種、各塗布菌数について2例ずつ実験を行った。これらは「実験動物の飼育および保存等に関する基準」に基づいた施設ガイドラインに則って行った。

(2) 培養

採血した試料は直ちに培養に供した。除去回路側の1~5本目は、表皮ブドウ球菌と黄色ブドウ球菌についてはBHI寒天培地、アクネ菌についてはGAM寒天培地で嫌気培養し、培地上に発育した菌数を計測して血液1mL中に存在した生菌数を求めた。本採血側の6~10本目の試料は無菌性の確認を血液培養用のカルチャーボトルを用いて行った(Table 1)。

(3) 皮膚片除去の確認

ラットの背中部分の皮膚を剃毛後、皮弁を切り取り、円筒状の16ゲージ針でパンチカットして小皮膚片を作成した。この皮膚片を、視認性をよくするために1%トルイジンブルーで染色した。これを、初流血除去回路付き血液バッグと同一のY字管分岐路のついた17G採血針の中に挿入し、イヌの前腕部静脈より血流量0.5~1.0mL/秒で採血し、5mLずつのフラクションを計50mL採血した。

各フラクションの血液をガーゼで濾過し、ガーゼ上に回収される皮膚片を目視でみつけることにより、どのフラクションで除去排出されたかを確認した。全部で15例の実験を実施した。

(4) ボランティアによる成分採血

テルモ社の成分採血用キットに初流血除去回路を組み込んだものを成分採血装置テルシスに装着し、ボランティアの肘静脈に穿刺した。この際、初流血を除去し、その実際の諸手順を検討した。

3. 結果

(1) 表皮常在菌の除去効果

表皮ブドウ球菌、黄色ブドウ球菌及びアクネ菌の何れの場合も、皮膚表面付着菌数が $10^4/\text{cm}^2$ 以下であれば、採血を開始してから27.0mL以降では菌は検出されなかった(Fig. 2)。付着菌数を少なくすると、培養で検出される菌数も少なくなった。また、菌数は採血初期のものほど多く、後のほうで再び菌数が多くなることはなかった。これらの結果は、実験法がある程度定量性を持つことを支持するとともに、穿刺直後の血液が、皮膚に付着する細菌を最も高濃度に含む事を示している。除去血と本採血とでは培養法が異なるが、本採血側のカルチャーボトル法は定量性はないものの、感度は寒天培地法に比べて劣る事はなく、むしろ高いと考えられる。

以上は試作した除去回路を用いた実験であり、実際の採血キットでは回路分岐部形状のわずかな違いにより、初流血の一部が分岐部にとどまって本採血側に混じる可能性もある。そのため、完成したキット(側副アームの取り付けの角度が異なる)と同じ形状の採血アームを用いて同様の実験を行ったが、本採血側

には細菌は検出されなかった。

(2) 皮膚片除去の確認

小皮膚片を採血針内において採血し、どのフラクションで皮膚片が回収されたかを Table 2 に示す。15 例中 14 例で採血後 10.0 mL 以内に小皮膚片は排出され、採血回路途中での停滞、付着等は生じなかった。残り 1 例は採血針内部に付着したままであった。

(3) 初流血除去回路付き成分採血キットによる採血

初流血除去回路を成分採血キットに組み込んで成分採血装置に装着し、その穿刺針をボランティアの肘正中静脈に穿刺した。バッグ本体側のクレンメを閉じ除去回路のクレンメを開けて初流血を約 20 mL 採取し、次に除去回路を閉じて本体側に採血した。キットを装置に装着することによって回路内圧が変化し、初流血の流出に影響を与えるようなことはなかった。本採血を通じて次のような点に気付かれた。1) 初流血を入れる小バッグがある程度の大きさでないと血液がたまるにしがって内圧が高まり、流速が落ちる。2) 側副回路全体の長さや採血中に静置する場所を慎重に決めないと、その重さで採血回路を献血者の前腕から引きずり落としかねない。3) 小バッグに入った血液は利用されずに採血終了までそのままにしておかれる。4) 当然ながら、手技がやや煩雑で、間違いを起こしかねない。これらの点を除いては、総じて操作性に大きな問題はなかった。

4. 考察

ウイルスの場合と異なり、輸血用血液

製剤中の細菌はバッグの中でダイナミックに増殖または死滅するので、安定したマーカーでスクリーニングすることが困難である。したがって、採血時のサンプルで陽性の結果を得ても、臨床的に意味のない検査結果を生ずる恐れがあり、できるだけ輸血する時に近い時点のサンプルを用いて細菌の同定・定量をしなければならない。

細菌汚染を少なくする方法のうち現在実施、または研究されているものは、検出・スクリーニングによるものが多い。従来から行われている方法は培養法である。採血後 24 時間ほどインキュベートしてから製剤からサンプリングし、それを好気性・嫌気性ボトルで培養する。48 時間後にはほぼ信頼できるデータが出てくる。感度の最もよい方法で、1 cfu/mL とされる。しかしながら日本では、血小板輸血実施までにこの結果を出すのは技術的に困難である。最近、菌体成分に対する抗体などを応用したイムノクロマトグラフィー法が改良されてきて、20 分ほどで結果が出るようになった。感度は 10^3 cfu/mL 程度である。スキヤニング法も有用である。血液製剤中の細菌を特異的に染色し、これを顕微鏡の視野に置いてカウントする方法である。バックグラウンドの処理が問題となるが、感度は 10^2 cfu/mL 程度である。すべての細菌が共有している 16S リボソーム RNA を検出しようとする試みもある。大量検体の処理に難があること、特に核酸抽出を多検体について行うことはやや困難である。また、コンタミネーションの問題、特に細菌由来の試薬の使用が問題となる。いずれにしても、時間的な制約から、検出・スクリーニングという手法は、現在の日本の少なくとも血小板製

剤に関しては適用が難しい。

病原因子の不活化は、ウイルスの不活化を含めて重要な問題である。現在行われつつある方法はすべて核酸を修飾するものであり、その宿主に対する影響などまだ未解決の部分が多い。また、輸血用血液成分に対する影響もゼロではない。現在慎重にその評価・治験が進められているところである。

これらに対して、採血時に細菌の混入を防ぐ方法は最も本質的な解決法といえる。輸血用血液製剤に混入する細菌には、穿刺する皮膚に存在するものと、献血者の血中に存在するものとの二つがある。後者については、菌血症の可能性のある献血者を問診の段階で的確に排除するしか現時点では手段がない。いっぽう穿刺部位の皮膚に存在する菌については、皮膚の消毒を徹底することが基本的な予防策であるが、毛嚢や皮脂腺などに存在する菌を死滅させることは事実上不可能であり、穿刺針がここを通過した場合には採血血液に細菌が混入する確率が高くなる。さらに、筒状の穿刺針が皮膚を貫く時に皮膚片が切り取られて採血血液に混入し、その中に潜んでいた細菌が保存中に増殖する可能性も考えられる。赤血球製剤中に検出される細菌は献血者の菌血症に由来するものが多いが、血小板製剤中に増殖する細菌は、穿刺時に皮膚から混入する球菌が比較的多いといわれる。したがって、採血の初期にとくに混入する皮膚に付着する菌を排除する方策は、血小板成分採血においてより意義が高いと考えられる。

今回の検討では、代表的なヒトの皮膚の常在菌である表皮ブドウ球菌、汚染が起こった場合に重大な症状を呈する可能性のある黄色ブドウ球菌、及び血液セ

ンターの工程管理で最も高頻度に検出されるアクネ菌の3種を使用した。実験で用いた $10^4/\text{cm}^2$ という菌数は、消毒をしていないヒトの手指の平均的な細菌数であり、採血現場では非現実的に高い濃度である。この実験で、皮膚常在菌数が $10^4/\text{cm}^2$ 以下であれば、採血時初流血液を 27.0mL 以上除去することにより、細菌の混入を防止できる可能性が高いことが示された。また培養で検出された菌数が、初流血のあとのほうほど少なくなることは、穿刺時にのみ細菌の混入が起こることを示唆しており、初流血の除去に意義があることを裏付けている。また、初流血液を 10mL 以上除去することにより、皮膚片の混入を防止できる可能性が高いことも示された。

初流血液除去回路はどの採血法にも適用できるが、前述のように、細菌汚染の最も起こりやすい血液製剤は血小板製剤であるので、まずこれを成分採血装置の血小板採血用キットに組み込み、その実際の使い勝手を検証した。その結果、20mL の血液が献血者の目の届くところに何にも利用されずに最後まで残ることが、献血者へ心理的に問題となると思われた。この方法を日本の血液センターでの採血に適用するにあたって最大の問題となるのは、採血量の増加の問題である。血小板採血の場合、返血後に回路に残る血液は 25~50mL、検査用に 20mL、合計 45~70mL が 1 回ごとに全血採血される。1 年に 12 回献血するとこれだけで 540~840mL が採血されることになる。さらにこの初流血を除去すれば 240mL 上乗せされることになり、その献血者が別に全血採血をしていれば無視できない採血量となる。この側副回路への血液をそのまま検査用に使用することがで

できれば都合がよい。欧米では、採血回路が献血者につながったままチューブシーラーを用いているが、日本ではこれを行えない。理論的にも実際にも本採血側と小バッグが完全に遮断され、採血バッグの無菌性を保ちつつここから検体採取ができる方法を現在検討中である。

初流血除去回路はすでにヨーロッパの主要国では献血時の採血に導入されて効果も検証されている。これによっても皮膚からの細菌の混入がまったくなくなるわけではないが、少しでも細菌の混入数を少なくすることに意義がある。すなわち初期混入数を少なくすることにより増殖カーブのたちあがり遅くし、有効期間内に重大な細菌濃度に達する製剤の数を少なくすることができれば、製剤の細菌汚染に関する安全性は高まるものと期待できる。

欧米でこの方法が実効を上げているとしても、日本でも同様であるかどうかは不明である。以前より日本での血液製剤の細菌汚染は欧米に比べて相当少ないが、これは日本人が風呂好き・きれい好きのせい、皮膚が比較的清潔であるためであるなどといわれてきた。日本でも効果があるかどうかを検証する事は非常に重要であり、近日中に、側副回路つきで採血した 3000 例の全血採血と、従来のバッグで採血した 3000 例について、その本採血側バッグの細菌の汚染率を比較するスタディを計画している。これで汚染率が低下する事が証明されれば、この回路を組みこんだ血小板採血キットを用いて採取した血小板製剤の有効期限を、3 日から 4 日或いは 5 日に延長することも可能ではないかと考えられる。

5. 結論

1. イヌを用いた実験で塗布した皮膚常在菌はすべて初期の 27ml からだけ検出可能であった。
2. また、検出される菌数は採血初期のものほど多かった。
3. 穿刺針による切り取り小皮膚片は殆どで最初の 10ml に回収された。
4. 側副回路を組み込んだ血小板採血キットによって採取した血小板製剤はその有効期限を延長できる可能性がある。

6. 健康危険情報

健康に被害を及ぼす事例の発生は認めなかった。

7. 研究学会発表

佐竹正博. 輸血用血液の病原因子不活化の考え方. 日本輸血学会雑誌. 49 (2): 223, 2003.

8. 知的所有権

なし.

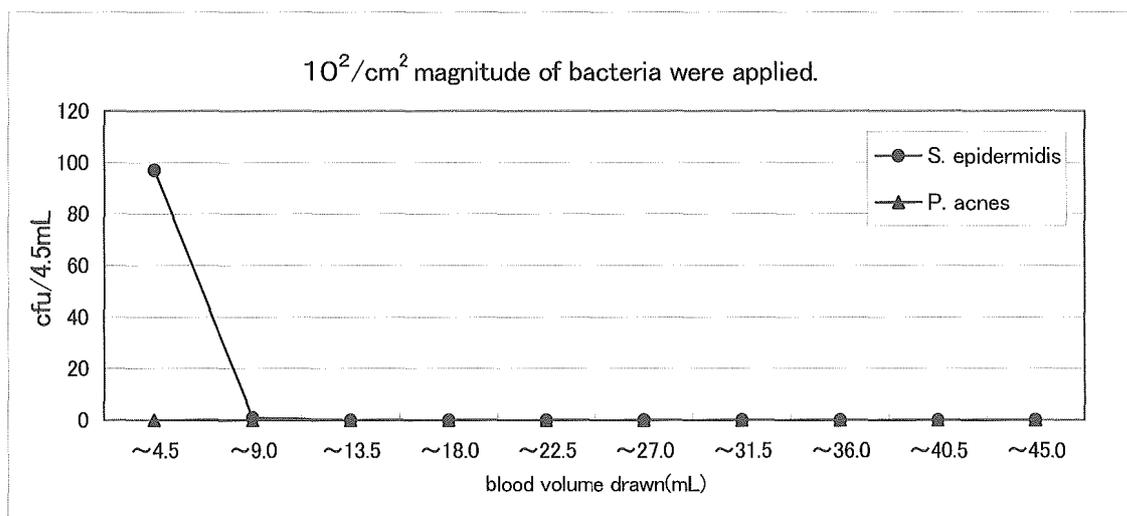
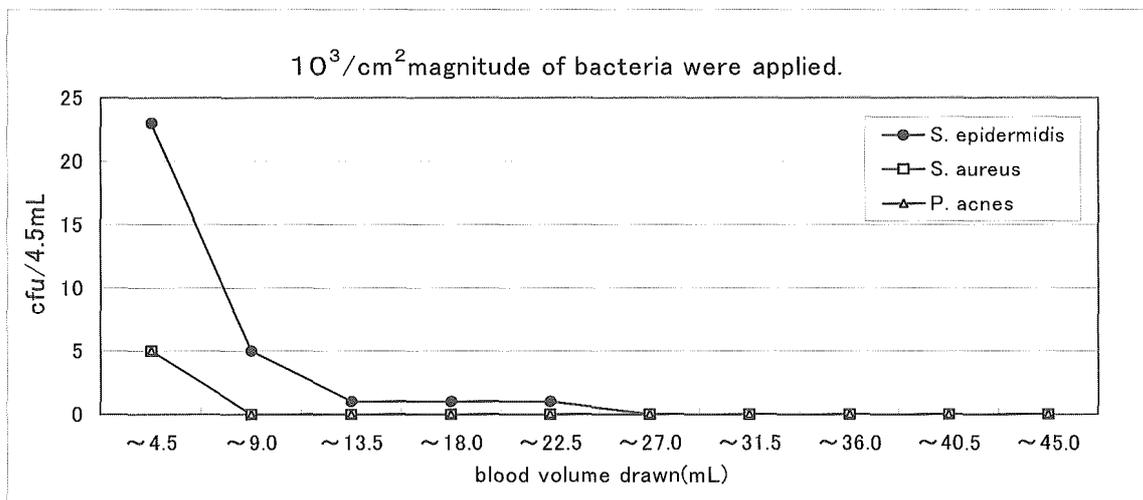
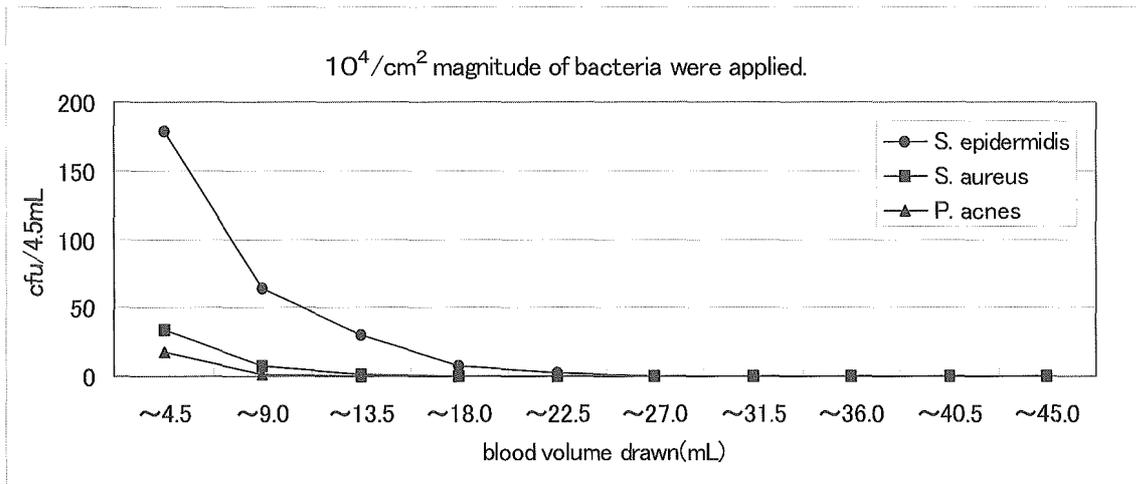


Table 1. Bacteria and culture conditions used for the animal experiment.

bacteria	No.of applied bacteria(cfu/cm ²)	media	Culture conditions
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	BHI agar	37°C, 24hrs
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁴ , 10 ³	BHI agar	37°C, 24 hrs
<i>Propionibacterium acnes</i>	10 ⁴ , 10 ³ , 10 ²	GAM agar	37°C, 96 hrs, anaerobic

Table 2. The result of collection experiment for skin plug.

Fractions where skin plug was found	frequencies
0 ~ 5 mL	13
5 ~10mL	1
10~15mL	0
others	1*

* Skin plug was found inside a needle after accomplishment of drawing.

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成15年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H15-リスク-025)

血小板保存に伴う損傷の評価

分担研究者 尾崎由基男 山梨大学医学部臨床検査医学 教授

研究要旨：

日本赤十字社製造濃縮血小板血漿の保存期間中の血小板機能を評価した。多血小板血漿の保存開始2日目より、ADPによる血小板凝集は低下したが、中濃度コラーゲンによる血小板凝集能は7日まで保たれていた。高ずり応力により血小板凝集能はコラーゲンと同様な傾向を示した。P-selectionの発現は2日目より増加し、その後保存期間とともに増加傾向を示した。高ずり応力によるPECAM-1の分解は、2日目、5日目では軽度であったが、7日目には優位に増加した。血小板 microparticle 産生も同様なタイムコースを示した。このように 血小板保存により血小板機能は時間依存性に低下するが、評価項目によりその程度が異なることが示唆された。コラーゲン凝集では比較的長期血小板機能は維持されるが、血小板活性化マーカー、血小板膜の integrity の傷害を示すマーカー発現は早期に増加した。

A. 研究目的

血小板は保存によりその機能が低下すると共に、血小板膜上の種々の形質が変化することが知られている。従来より、血小板保存に伴う血小板損傷の指標として、陰性荷電をもつ磷脂質と結合する annexin V の血小板膜への結合、 α 顆粒膜上に存在する p-selectin の血小板膜上への発現などが使われてきた。これらの現象は血小板保存中に血小板細胞膜の

perturbation が起きていることを示すものであり、さらに血小板 apoptosis に近い変化が起きていることを示唆する。実際、annexin V は他の細胞系に於いて apoptosis の良い指標とされている。apoptosis に伴うもう一つの現象は、細胞膜から小さい塊が放出される microparticle (MP) formation である。血小板保存に於いても、既に MP が多数産生されることが報告されている。

我々は、これらのことより、血小板保存時の血小板機能低下を apoptosis の進行ととらえ、annexin V、P-selectin、MP formation と共に、apoptosis に関与する分子を同時評価することにした。従来より血小板膜上には GPIIb/IIIa や GPIb といった血小板凝集に関与する糖タンパクが豊富に存在することが知られている。これらの蛋白に劣らず多くのコピー数が存在する膜蛋白として、PECAM-1 (CD31) が知られていたが、その機能は不明であった。最近になり、この蛋白が他の細胞系に於いて apoptosis を抑制していることが報告されており、この蛋白の非常にユニークな機能が注目を集めている。

この研究は、保存による血小板損傷の評価に以上に挙げた血小板表面形質、血小板機能が適当であるかを探索するものである。

昨年は当教室にて健常人より採血した血液 200cc より採取した多血小板血漿を血小板保存用バッグに入れた後、保存期間による血小板機能の評価した。しかし、血小板保存用バッグに入れる多血小板血漿、血小板数が保存期間中の血小板機能に大きな影響を与えるかのせいが示唆されたため、今回は日赤から供給された濃縮血小板血漿を用いて実験した。

B. 研究方法

日赤血液センターより入手した濃縮血小板血漿を使用した。通常、成分採血した濃縮血小板血症であり、1 バッグあたり 10 単位の血小板血漿を含む。肝機能異常、不規則抗体等で検査落ちしたものを採血後 2 日目より評価した。血小板は 20℃ 振盪の通常血小板保存条件下に

置く。以降 2 日、5 日、7 日、10 日後に多血小板血漿を少量抜き取り、ADP 凝集、コラーゲン凝集、cone-plate 法により高ずり応力下での血小板凝集を測定する。フローサイトメーターを用い、血小板膜上の GPII b、p-selectin、PECAM-1 の発現、及び血小板 MP 産生を評価する。同時に、抗 PECAM-1 抗体を用い、PECAM-1 の免疫沈降、Western blot を行い、PECAM-1 の変化を調べる。

C. 研究結果

1) 血小板凝集

採血後 2 日目より、10 μ M ADP 惹起による血小板凝集は低下しており、2 次凝集を惹起できなかった。7 日目には ADP による血小板凝集はほとんど消失した。一方、10 μ g/ml コラーゲンによる血小板凝集は、7 日目より軽度の低下傾向を示したが、5 日まで十分に保たれていた。高ずり応力により血小板凝集は 2 日目で 40% 程度の低下を示したが、以降 ほぼ定常状態であり、7 日目でも十分な凝集塊の形成を認めた。

2) 表面マーカー及び血小板 MP 産生

P-selection の発現は 2 日目より増加し、その後保存期間とともに増加傾向を示した。7 日目には約 40% の血小板が p-selectin 陽性となった。血小板 MP 産生は保存後 2 日目には認めなかったが、5 日、7 日後には軽度認めた。高ずり応力をかけると、MP 産生はより著明であり、5 日後には有意に増加した。PECAM-1 の発現を見ると、全体の血小板の発現は変化しないが、MP 上の PECAM-1 が特異的に減少することが認

められた。

3) 免疫沈降法による PECAM-1 の変化

前回の検討により 高ずり応力をかけることにより PECAM-1 が分解され、元来 130kDa の分子量の PECAM-1 が 100kDa の fragment に分解され、細胞外液中に放出されることを見いだした。この分解は高ずり応力により calpain が活性化され、それにより PECAM-1 が分解されると考えられた。

高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2日目、5日目では軽度であったが、7日目には優位に増加した。また、フローサイトメーターを用いた検討により、PECAM-1 の表現が低下した血小板において、MP 産生が高まり、またそれが PECAM-1 の分解と良い相関を示すことが示された。

D. 考察

保存期間中の日赤濃縮血小板血漿の血小板機能を評価するためには、ADP 刺激血小板凝集能は 2 目にしてすでに 2 次凝集が惹起できず、ではその低下が急速すぎ、不適當と思われた。これは、遠心の過程での赤血球より放出された ADP、また保存の期間中に崩壊した血小板から出た ADP が血小板の ADP 受容体の desensitization を起こすためと考えられる。コラーゲンまたは高ずり応力下での血小板凝集能では保存第 7 日目までは十分な血小板凝集能が保持されており、これらの刺激により血小板機能を評価する方が、実用的であろう。

p-selectin の血小板表面の発現がかなり早い時期に起き、また時間とともに相当数の血小板に起きた。これは、血小板

活性化というよりは血小板膜の integrity が早期より傷害されることを示すと思われるが、このデータは単なる血小板表面上の p-selectin の陽性化を見たものであり、血小板表面上の p-selectin を定量的に評価したものではない。陽性率では確かに高値を示すが、コラーゲン凝集の結果などを考慮すると、血小板機能は保存されており、p-selectin の陽性率とは 矛盾したデータとなった。現在のような p-selectin の陽性率は、保存血小板の機能評価には不適切と思われる。これからは 細胞内の何%の p-selectin が細胞膜上に露出するのか等 定量的な評価が必要と考えられる。

前回の研究と同様 今回の研究でも、我々は 血小板保存に伴い PECAM-1 が分解されること、PECAM-1 が分解された血小板は多くの microparticle を産生するようになること、これらの現象が血小板の機能低下と相関することを見いだした。

前回の研究と異なり 今回は実際に日赤から供給される濃縮血小板血漿を用いて保存期間中における血小板機能検査を行ったが、結果的には前回の実験室で作成した多血小板血漿を保存した結果とほぼ同様であった。血小板機能は 採血後 5～7 間ではコラーゲン凝集、高ずり応力により凝集で判定する限りは保持されると考えられる。

E. 結論

濃縮血小板血漿の保存開始 2 日目より、ADP 惹起による血小板凝集は低下したが、十分量のコラーゲンによる血小板凝集能は 7 日まで保たれていた。P-selection の発現は 2 日目より増加し、

その後保存期間とともに増加傾向を示した。高ずり応力による PECAM-1 の分解は、2 日目、5 日目では軽度であったが、7 日目には優位に増加した。これらのことより、ADP 惹起血小板凝集、p-selectin は保存状態における血小板機能評価には適さないと考えられる。コラーゲン惹起血小板凝集、高ずり応力下の血小板凝集の方が、機能判定に有用である。高ずり応力下での PECAM-1 の分解、細胞膜上の発現低下、血小板 microparticle 産生は、コラーゲン凝集と同様なタイムコースを示した。このように血小板保存により血小板機能は時間依存性に低下するが、

それに伴い血小板活性化マーカー、血小板膜の integrity の傷害を示すマーカー発現が増加した。

F. 健康危険情報

健康に危険をきたす事象は発生しなかった。

G. 研究発表

発表予定である。

H. 知的所有権

なし。

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業
平成15年度研究報告書

「血小板製剤の有効期限延長と安全性確保に関する研究」
(H15-リスク-025)

ずり応力下血小板機能測定を用いた保存血小板の血栓形成能評価

分担研究者 宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室医長

研究要旨：

血小板製剤の有効期限を現在の3日間から5日間へ延長することの妥当性を検討するために、保存期間の異なる濃厚血小板製剤の機能の差異について生理的流動状況下を模倣する評価系を用い検討した。血液センターより、有効期限切れもしくは検査落ち等で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤の供与を受けた。供与を受けた製剤と同型の血液型の健康成人の全血を、buffy coat を取り除いた赤血球成分と血小板欠乏血漿に分離し、保存期間の異なる（1日から7日間）濃厚血小板を最終血小板数が約150,000/ μ l、ヘマトクリットが45%となるように混合し再構成血を構築した。これら検体を、コラーゲンを固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始10分後に形成された血栓の高さを測定した。7日保存後でも、濃厚血小板製剤は、ずり応力下血栓形成能を保持していた。血小板の初期粘着はいずれの保存期間においても保持されていたが、保存期間が1日、3日、5日、7日と長くなるにつれて血小板血栓の3次元的成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。濃厚血小板製剤は、保存期間中に血小板の活性化過程に障害が起きる可能性が示唆された。しかしながら、同一保存期間でも血小板製剤間に血栓形成能に格差が認められ、今後、それに関与する因子を解析することで、より最適な保存方法が確立できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

濃厚血小板製剤は、有効期限が欧米

の5日間と比較して日本では3日間と短い。近年、悪性腫瘍に対する化学療

法の進歩により、その支持療法としての血小板輸血の需要が増大するものの、少子高齢化により献血者数は頭打ちの傾向にあり、必要血小板製剤の確保が問題になりつつある。血小板製剤の有効期限の延長は、血小板製剤の供給の増加につながるため、早急に検討すべき問題である。血小板製剤の有効期限を現在の3日間から欧米と同様の5日間へ延長することの妥当性を評価する一つの要件として、長期保存によっても血小板機能が保持されているかどうかの検討が重要となる。

近年、血小板機能を評価する場合に、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下での血小板機能を考慮する必要性が指摘され、ずり応力下血小板機能評価の新しい概念が確立されつつある。この新しい測定系を用いることで、生理的条件に近い系として、長期保存が血小板機能に与える影響を *in vitro* で、血小板板膜レセプターと各種粘着蛋白との相互作用を含めた詳細な評価が可能と思われる。

今回、我々は、保存期間の異なる濃厚血小板製剤の機能の差異について生理的流動状況下を模倣する評価系を用い検討した。

B. 研究方法

1) ずり応力下血小板機能測定

コラーゲン Type 1 を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバー内に、血小板を蛍光色素（メパクリン）で標識した全血を流し込み、高ずり応力(2000/s)のかかる部位

でのコラーゲン固相表面上での血小板血栓形成過程を倒立型蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察した。また、これらの画像を CCD カメラによりコンピュータに取り込みデジタル化し、画像解析を行った。さらに形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすることにより血小板血栓の 3 次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定することにより血小板機能のもう一つの指標とした。

2) 血小板除去再構成血の作成

評価する血小板製剤と ABO 式ならびに RH(D)同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人からインフォームドコンセントを得て採血を行い、選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンを終濃度 125 µg/ml で抗凝固剤として添加した。採血した全血を 800 rpm で 10 分間遠心し、その血小板富血漿 (platelet rich plasma: PRP) を採取した。残った血液から buffy coat を注意深く取り除いた後、3,600 rpm にて 10 分間遠心し、その上清を血小板欠乏血漿 (platelet poor plasma: PPP) として採取した。

最終的に残った赤血球成分と PPP をヘマトクリットが 45% になるように混合し、血小板除去再構成血とした（陰性コントロール：PPP 加再構成血）。また、PRP と PPP を最終血小板濃度が 150,000/µl、ヘマトクリットが 45% となるように赤血球成分と混合し、正常コントロール (PRP 加再構成血) とした。

3) 保存濃厚血小板の機能評価

大阪赤十字血液センターより、有効

期限切れもしくは検査落ち等で医療機関で使用できない濃厚血小板製剤の供与を受けた。供与を受けた製剤と ABO 式ならびに RH(D)同型で、なおかつ不規則抗体の陰性を確認した健康成人全血から、上述した方法で、赤血球成分、血小板富血漿 (PRP)、血小板欠乏血漿 (PPP) を作成した。供与を受けた保存期間の異なる (1 日から 7 日間) 濃厚血小板を最終血小板数が約 150,000/ μ l、ヘマトクリットが 45%となるように、赤血球成分ならびに PPP と混合し、再構成血を構築した (PC 加再構成血)。

これら検体を、生体内で血小板が存在する環境である流動状況下を模倣できるシステムであるコラーゲン type I を固相化したガラスプレートを組み込んだ平行板型フローチャンバーを用いたずり応力下血小板機能測定系にて、その血栓系形成能を評価した。血栓形成過程をリアルタイムに観察するとともに、注入開始 10 分後に形成された血栓の状態と高さを測定した。

C. 研究結果

1) 再構成血のずり応力下血小板血栓形成過程の検討

健康成人 (n=11) からの血液を用い、正常コントロールと陰性コントロールの測定を行った。正常コントロールとしての PRP 加再構成血 (最終血小板数 155,818(平均) \pm 15,236(1 S.D.)/ μ l, n=11) と陰性コントロールとしての PPP 加再構成血 (最終血小板数 20,545 \pm 7487/ μ l, n=11) との比較検討を行った。

それぞれの検体を並行板型フローチ

ャンバーに流し込み、2,000/s の高ずり速度下で、測定開始 10 分後に形成された血小板血栓の代表的な像 (血栓の高さが中央値を示した実験の像) を figure 1 の下図 (PRP: 下図左、PPP: 下図右) に示す。PRP 加構成血では、コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3 次元的血小板血栓形成過程が観察された。一方、陰性コントロールとして用いた PPP 加構成血を用いた実験では、血小板がまばらにコラーゲンを固相化した表面に粘着するのみで、三次元的な血栓成長は認められなかった。

測定開始 10 分後に形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすることで血小板血栓の 3 次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定した。陰性コントロールとして用いた PPP 加構成血の最終的な血栓の高さは、3.36 \pm 0.9 μ m (n=11) であり (figure 2: PPP)、正常コントロールとして用いた PRP 加構成血の、血小板血栓の高さは 21.7 \pm 3.0 μ m (n=11) であった (figure 2: PRP)。血小板再添加による血栓形成の回復が優位に認められた (p<0.05)。

2) 保存期間が濃厚血小板製剤のずり応力下血栓形成能に与える影響

大阪赤十字血液センターから供与を受けた保存期間の異なる (1、3、5、7 日後) の濃厚血小板製剤を研究方法の項で上述した方法で、血小板終濃度 150,000/ μ l となるよう添加した PC 加再構成血の血小板血栓形成過程を観察した。上記コントロール実験と同様に

2,000/s の比較的高ずり速度下で、測定開始 10 分後に形成された血小板血栓像を検討した (figure 1 上図)。1 日保存血小板製剤 (figure 1: 1 day) では、正常コントロールである PRP 加再構成血 (figure 1: PRP) とほぼ同様に、コラーゲンを固相化した表面への血小板の rolling から初期粘着、その後の血小板凝集、さらには、3 次元的血小板血栓形成過程が観察された。しかしながら、保存期間 3 日の血小板製剤を用いた実験では (figure 1: 3 days)、初期粘着はほぼ正常に認められるものの、3 次元的血栓成長過程が障害されていた。さらに、5 日間保存 (figure 1: 5 days)、7 日間保存 (figure 1: 7days) では、より 3 次元的血栓形成過程の障害が明らかとなり、個々の血小板血栓の集合が小さくなる現象が観察された。

測定開始 10 分後に形成された血小板血栓を Z 方向にスキャンすることで血小板血栓の 3 次元イメージを再構築し、血小板血栓の高さを測定した。1 日保存血小板製剤を添加した PC 加再構成血 (最終血小板数 142,000/ μl , n=1) の最終血小板血栓の高さは、18.8. μm であり、正常コントロールである PRP 加再構成血とあまり差が無かった (figure 2: 1)。しかしながら、3 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 169,600 \pm 8,000/ μl , n=3)、5 日間保存血小板製剤 (最終血小板濃度 155,500 \pm 12,400/ μl , n=6)、7 日間保存血小板製剤 (最終血小板数 130,000/ μl , n=1) を加えた PC 加再構成血を用いた実験では、最終的な血小板血栓の高さは 3 日間保存で 14.6 \pm 5.54

μm (figure 2: 3)、5 日間保存で 10.3 \pm 0.59 μm (figure 2: 5)、7 日間保存で 7.8. μm (figure 2: 7) と、保存期間が長くなるにつれて最終的な血小板血栓の高さが低くなる傾向が認められ、5 日間保存で正常コントロールに比して血小板血栓の高さは約 50% に減少した (figure 2)。

3) 濃厚血小板製剤間の機能格差

血小板製剤間に機能の差が無いかどうかを検討するために、各再構成血の最終血小板濃度と、試験開始 10 分後の最終血小板血栓の高さを比較検討した (figure 3)。その結果、最終血小板数が本研究で用いた 130,000/ μl から 181,000/ μl までの間では、最終血小板濃度と血小板血栓の高さには相関はなく、保存期間の違いが最終血小板血栓の高さを規定する因子である可能性が高いことが判明した。しかしながら、検討した 3 日間保存濃厚血小板製剤 3 製剤中の 1 製剤が、最終血小板血栓の高さが正常コントロールである PRP 加再構成血とほぼ同様の高さを示し、他の 2 製剤と比較して高い (血小板の機能が良好である) 値を示した (figure 3: 矢印で示したもの)。したがって、血小板製剤間で、血小板機能に格差がある可能性が示唆された。

これに関与する因子を明らかにする目的で、今回検討した濃厚血小板製剤の詳細なデータを列記した (Table 1)。各濃厚血小板製剤の血液型、単位数、血小板製剤中の血小板数を検討したが、症例数が少ないこともあり、血小板機能に関与する明らかな要因は認められなかった。

D. 考案

日本社会の少子高齢化に伴う献血者数の頭打ちを背景として、血小板製剤を支持療法として長期間必要とする血液疾患、止血困難に陥り易い心臓、肝臓外科等に代表される外科疾患患者の増加により、血小板製剤の需給バランスの悪化が、現実のものとして問題化している。需給バランスの改善のために、血小板製剤の有効期限の延長は有効な手段となる。実際、日本における3日間（72時間）と比較して欧米では5日間と血小板製剤の保存可能期間が長い。さらに、欧米では7日間に延長しようとする試みもなされている。

欧米における血小板製剤の機能に対する保存期間の与える影響についての報告を見てみると、*in vitro* 測定系では、血小板活性化マーカーの一つである p-selectin の発現、血小板凝集計を用いた ADP 等アゴニストに依存した血小板凝集能、Hypotonic shock response、Extent of shape change 等が機能評価指標として用いられており、*in vivo* 測定系では、血小板回収率等を用いて評価されている。

しかしながら、最近、血小板機能を検討する際の測定環境の重要性が指摘されている。すなわち、血小板は生体内では、血管内皮近傍を流れ、血流の特性による速度勾配によって生じるずり応力に絶えず晒されながら循環している。血管内皮細胞は nitric oxide, prostaglandin I₂ 等を産生し、血小板粘着が起こらないように血管のダイナミク

スを支えている。しかし、一旦血管内皮に、外傷等で損傷が起こると、血管内皮下組織（主にコラーゲンからなる）と反応する形で血小板粘着がおこり、それに引き続いて血小板凝集、血栓形成が引き起こされる。この際、ずり応力依存性に血小板粘着凝集が引き起こされることが明らかとなっている。したがって、生体内での血小板機能を評価する際には、血流存在下（ずり応力下）における血小板の機能を常に考慮する必要がある。

今回、我々は、血小板製剤の有効期限を現在の3日間（72時間）から5日間へ延長することによる血小板機能に与える影響を、出来る限り生理的状況下に近い形での基礎検討を行うために、全血を用い流動状況下で検討する方法を用いた。すなわち、平行板型フローチャンバーを用い、正常健康人の全血より作成した再構成血に保存期間の異なる濃厚血小板製剤を添加した検体のコラーゲン固相表面上でのずり応力下血小板血栓形成能を測定した。

その結果、陰性コントロールとして用いた PPP 加再構成血と比較して、7日間保存血小板製剤でも、ずり応力下血栓形成能を保持していた。しかしながら、保存期間が長くなるにつれて血小板血栓の3次元的成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められ、5日間保存で正常コントロールに比して血小板血栓の高さは約50%に減少した。このことは、濃厚血小板製剤中の血小板は、保存期間中に血小板活性化過程に障害される可

能性が示唆された。従来、血小板製剤は、血液疾患における化学療法等での出血傾向を防ぐために予防投与されるための使用が多くを占めた。5日間保存血小板製剤でもずり応力下血栓形成能を保持し、正常コントロールとしてのPRP加再構成血と比較して、50%程度の血小板血栓の高さを維持しており、この血液疾患における予防投与という点では、その機能に問題がないように思われる。しかしながら、外科疾患周術期の止血のために用いる場合、この保存期間に依存したずり応力下血栓形成能の低下は問題となる可能性がある。また、この現象は、心臓大血管外科周術期に止血困難に陥った場合、生血の有効性を主張する心臓外科医、麻酔科医がいる実態をある程度反映しているのかも知れない。

保存期間が同一でも、血小板製剤間に機能格差が認められた。今回の検討では、血小板製剤中の血小板数、単位数等、製剤間機能格差に関与する明らかな因子は同定できなかったが、実施した例数が少ないこともあり、今後実施例数を増やすことで、明らかにできる可能性がある。加えて、可能であれば異なった血小板保護液ならびに血液バッグが血小板機能に与える影響等についても来年度以降検討し、最終的には血小板機能が最も良好に保存される至適条件を決定したい。

E. 結論

- 7日間保存後でも、濃厚血小板製剤はずり応力下血栓形成能を保持し

ていた。

- 保存期間が長くなるにつれて血小板血栓の3次元成長が障害され、形成された血小板血栓の高さが減少する傾向が認められた。
- 濃厚血小板製剤は、保存期間中に血小板活性化過程に障害が起きる可能性が示唆された。
- 血小板製剤間に機能格差が認められ、それに関与する因子を解析することで、より最適な保存方法が確立される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

健康に危険を及ぼす事象は発生しなかった。

G. 研究発表

(関連する発表論文)

- 1) Miyata S, Kawai T, Yamamoto S, Takada M, Iwatani Y, Uchida O, Imanaka H, Sase K, Yagihara T, Kuro M: Network computer-assisted transfusion management system for accurate blood component-recipient identification at the bedside. *Transfusion* 2004, 44: 364-372.

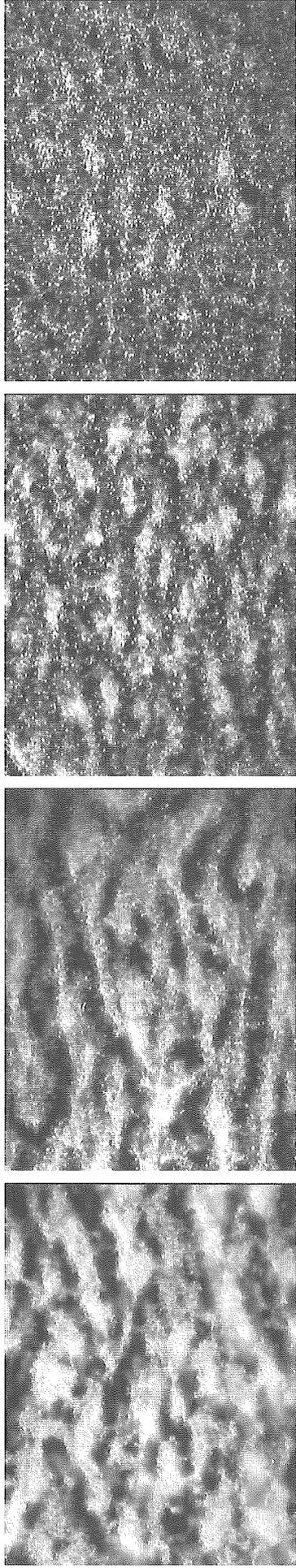
(関連する学会発表)

- 1) Miyata S. Network computer-assisted transfusion management system for accurate unit-recipient identification at the bedside. American Association of Blood Banks 2003 Annual Meeting (Educational Program). San Diego, U.S.A. 2003

- 2) 山本賢、吉村尋典、岩谷泰之、河合健、大戸 齊、柴田 弘俊、宮田茂樹：保存期間が濃厚血小板製剤の機能に与える影響－ずり応力下血栓形成能を用いた評価－. 第 52 回日本輸血学会総会. June 23-25, 2004, 札幌 (発表予定)
- 3) 宮田茂樹、亀井政孝. 人工心肺使用時における輸血. 第 52 回日本輸血学会総会 (シンポジウム). June 23-25, 2004, 札幌 (発表予定)

H. 知的所有権

なし。



1 day

3 days

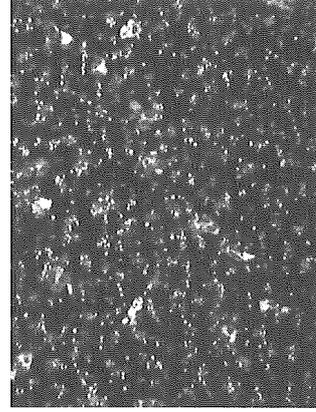
5 days

7 days

Storage time



PRP



PPP

Control

Figure 1. Impact of storage time on shear-induced platelet thrombus formation induced by PLT concentrates

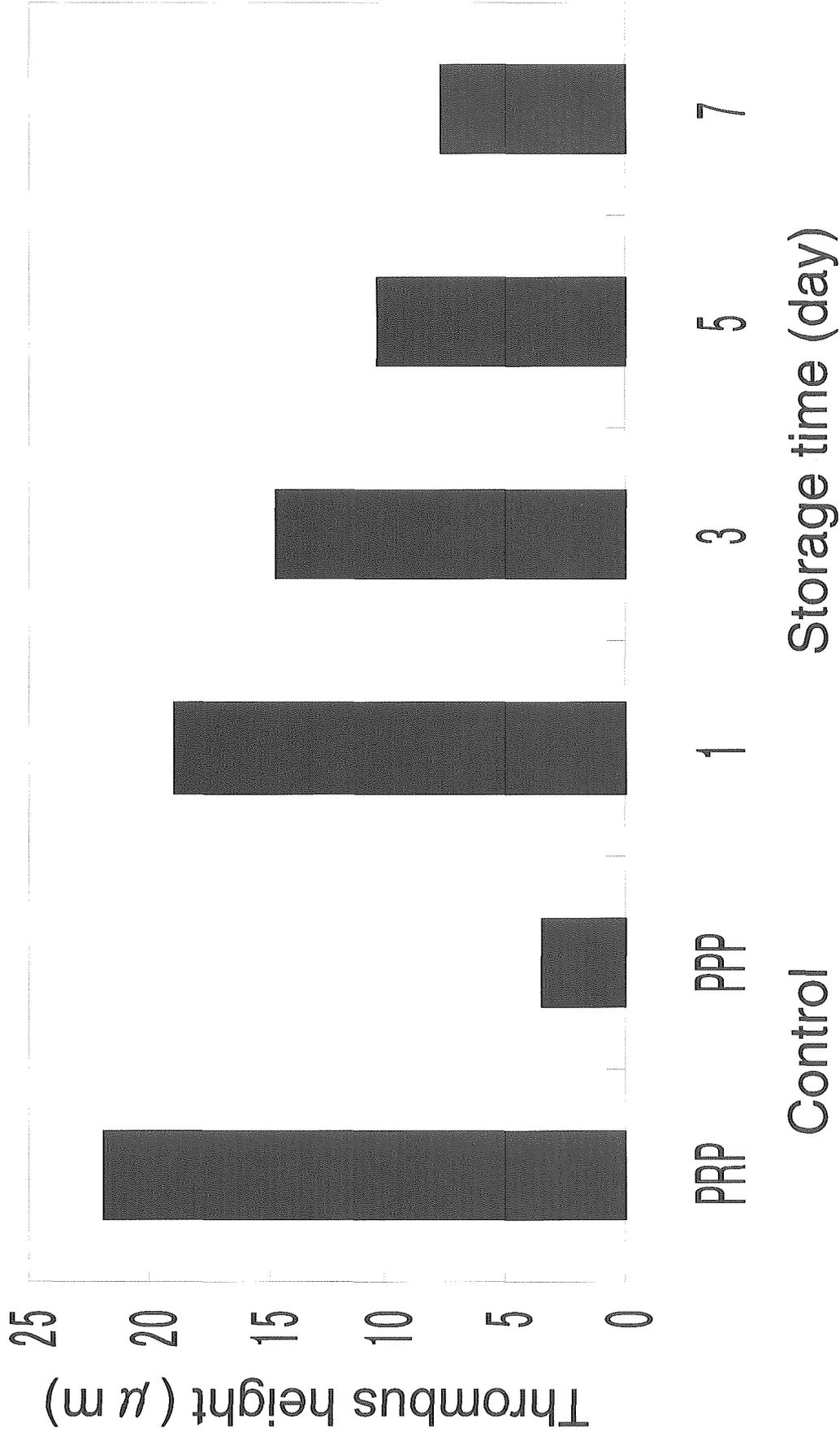


Figure 2. Influence of storage time on thrombus height after 10 min perfusion

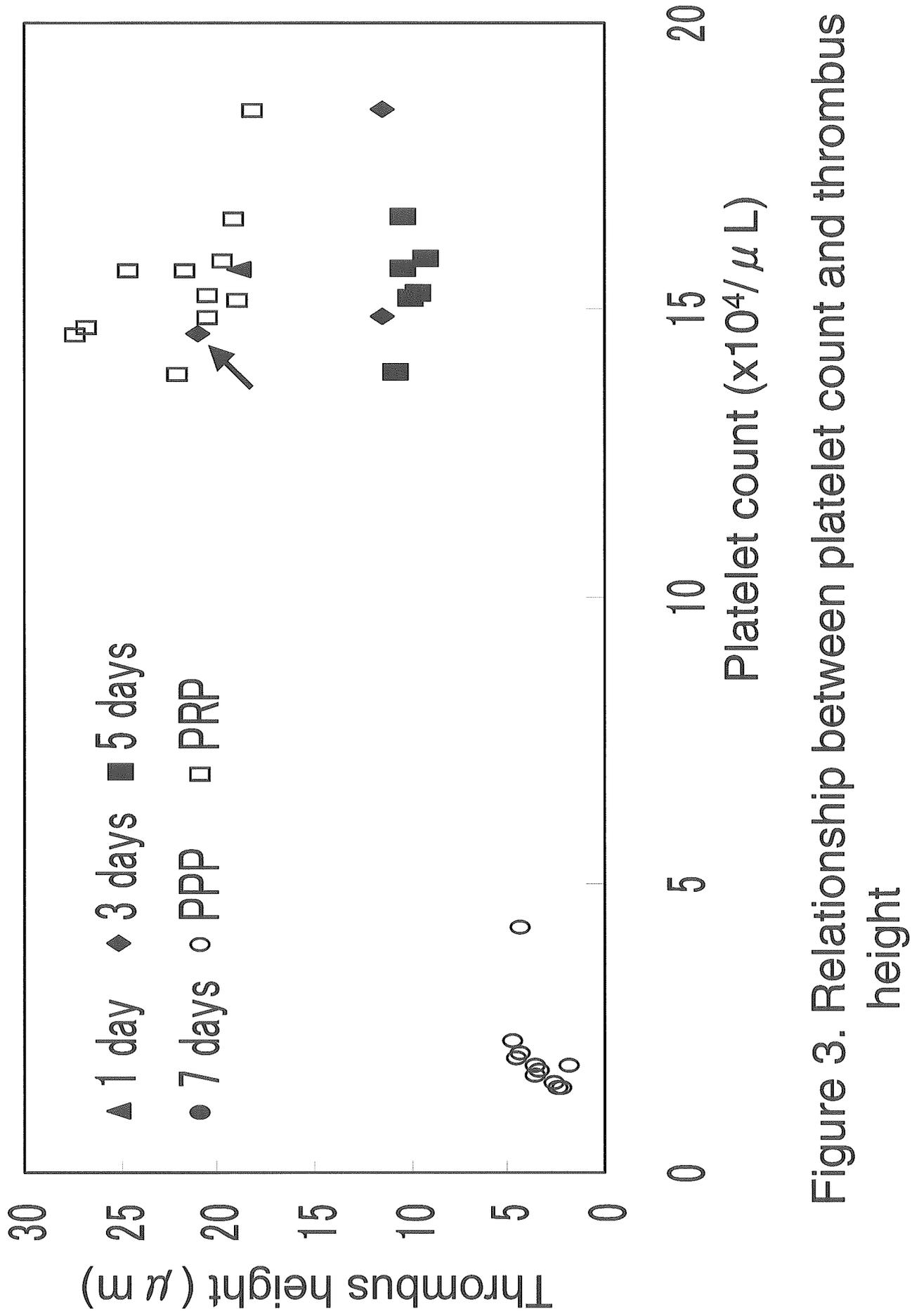


Figure 3. Relationship between platelet count and thrombus height